

A szárazságstressz hatása a búza gametogenezisére, fertilitására és korai szemfejlődésére

Doktori értekezés tézisei

Fábián Attila László

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola
Vezető: Dr. Erdei Anna

Kísérletes Növénybiológia Doktori Program
Vezető: Dr. Szigeti Zoltán

Témavezető:
Jäger Katalin Ph.D.
tudományos főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont
Mezőgazdasági Intézet
Növényi Sejtbiológia Osztály

Martonvásár

2012

Bevezetés

A búza (*Triticum aestivum* L.) Európában évszázadok óta a legfontosabb termesztett étkezési célú gabonaféle, az ENSZ Élelmezési és Mezőgazdasági Szervezetének (FAO) adatai szerint világszerte a legnagyobb termőterületen vetett és a második legnagyobb mennyiségű termést adó gabonanövény (Curtis 2002). A búza termesztése során szembe kell néznünk a klímaváltozás egyik fő következményével, az egyre gyakoribbá váló aszályos időszakokkal, melyek jelentősen csökkentik a betakarítható termés mennyiségét. Ennek megfelelően a szárazsággal szemben toleráns genotípusok nemesítése egyre fontosabbá válik. Kiemelt jelentőséggel bír azoknak a tulajdonságoknak a vizsgálata, amelyek hozzájárulnak egy-egy jó szárazságtűrő fajta termésbiztonságához.

Célkitűzés

Munkánk során a búzában a reprodukív életszakaszban fellépő szárazság hatásának, illetve a növények által az arra adott válaszoknak minél több aspektusát szeretnénk volna megvizsgálni. Kitűzött céljaink a következők voltak:

- 1.A búza különböző generatív fejlődési fázisaiban (meiózis, antézis, korai szemfejlődés) alkalmazott vízmegvonás hatásának vizsgálata a termésképzést meghatározó folyamatokra, annak érdekében, hogy felmérhető legyen a vízhiány károsító hatásának fejlődési állapottól való függése.
- 2.A növényekben a szárazság hatására lezajló élettani folyamatok tanulmányozása fiziológiai és enzimológiai vizsgálatok segítségével, a szárazságtolerancia lehetséges elemeinek meghatározása érdekében.
- 3.A szárazságstressz hatására a fejlődő szemtermésekben lezajló sejt, illetve szöveti szintű strukturális változások meghatározása és kvantitatívvá tétele szövettani és statisztikai módszerek alkalmazásával.

Anyagok és módszerek

Növényanyag és a növénynevelés körülményei

Kísérleteink során a szárazságra érzékeny Cappelle Desprez és a szárazság toleráns Plainsman V őszi búza genotípusokat vizsgáltuk (<http://genbank.vurw.cz/wheat/pedigree>). A növényeket cserepekbe, szántóföldi talaj-homok-tőzeg keverékbe (3:1:1, v/v/v) ültettük, növénynevelő kamrákban a T1 tavaszi növénynevelő program (Tischner és mtsi 1997) alkalmazásával neveltük $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás mellett. A növényeket a talaj vízkapacitás értékéig öntöztük.

Stresszkörülmények

A szárazságstresszt hét napon át tartó, teljes vízmegvonással idéztük elő a meiózis, az antézis valamint a korai szemfejlődés idején. A kezelések után a növényeket újra öntözni kezdtük és a kontroll körülményeknek megfelelően teljes érettségig neveltük.

A víztartalom meghatározása

A talaj térfogatarányos víztartalmát HH2 típusú talajnedvesség-mérővel (Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK) mértük. A talaj relatív víztartalmának meghatározását (RVT %) Augé és munkatársai (1998) módszerével végeztük.

Szöveti vizsgálatok

A szemfejlődés nyomon követéséhez a termőket kémiai módszerrel fixáltuk, majd Spurr (1969) módszere szerint epoxi gyantába ágyaztuk. A termőkből félvékony ($1 \mu\text{m}$ vastagságú) metszeteket készítettünk Ultracut-E mikrotom (Reichert-Jung, Heidelberg, Németország) segítségével. A szénhidrátokat perjódsvas Schiff (PAS), a fehérjéket Coomassie Brilliant Blue festéssel jelöltük.

Sztereológiai analízis

A fejlődő szemtermések endospermiumában található A és B típusú keményítőszemcsék, fehérjetestek sejtenkénti számát valamint az endospermium sejtek egységnyi térfogatra viszonyított számát Weibel és Gomez (1962) módszere alapján számítottuk ki.

Pásztázó elektronmikroszkópia

Az érett szemtermések endospermiumában található keményítőszemcsék eloszlását Zeiss EM 910 típusú elektronmikroszkóppal pásztázó üzemmódban, szekunder elektron (SE) detektor alkalmazásával 20 kV gyorsítófeszültség mellett vizsgáltuk.

A fotoszintetikus folyamatok vizsgálata

Az alkalmazott kezelések fotoszintetikus folyamatokra kifejtett hatását LCi infravörös gázanalizátorral (ADC BioScientific Ltd., Hertfordshire, UK) vizsgáltuk. A nettó széndioxid asszimilációs ráta (A_{net}), a sztómakonduktancia (g_s) és az intercelluláris széndioxid koncentráció (C_i) kerültek meghatározásra a vízmegvonás kezdetét megelőző naptól a visszaöntözést követő ötödik napig. A PS II effektív kvantumhatásfokát (Φ_{PSII}) PAM-2000 (Walz, Németország) klorofill fluorométer segítségével határoztuk meg.

Kolorimetriás enzimaktivitás mérés

A transzportált szacharózt hasító savas invertáz valamint szacharóz szintáz enzimek aktivitását a stresszkezelések végén és a visszaöntözést követő ötödik napon mértük, kolorimetriás módszerek alkalmazásával. A savas invertázok aktivitását Miller (1959) módszere szerint, a szacharóz szintáz aktivitását pedig Ranwala és Miller (1998) módszerének megfelelően, kisebb változtatásokkal határoztuk meg. A mérések statisztikai elemzését a három ismétlésből származó adatok átlagán végeztük el.

Az enzimaktivitások in situ szöveti lokalizációja

A vizsgált enzimek aktivitásának fejlődő szemtermésekben történő *in situ* szöveti lokalizációját Sergeeva és Vrugdenhil (2002) módszerének megfelelően végeztük, az invertáz és a szacharóz szintáz aktivitását különböző segítő enzimeken keresztül a NADH molekula termeléséhez kapcsolva.

Ozmotikus adaptáció meghatározása

A fajták ozmotikus adaptációs képességét a zászlóslevelek sejtnedvének ozmotikus potenciálja alapján állapítottuk meg (Moinuddin és mtsi 2005). A sejtnedvet kézi préssel nyertük ki, annak ozmotikus potenciálját Osmomat 030 típusú fagyáspontmérő ozmométerrel (Gonotec GmbH, Berlin, Németország) mértük meg. Az ozmotikus adaptációt a rehidratált kontroll és kezelt zászlóslevelek sejtnedvének ozmotikus potenciálkülönbségeként adtuk meg.

A terméslemek meghatározása

A kontroll és kezelt növények főkalászeit a teljes érés állapotában gyűjtöttük be, majd meghatároztuk a kalászkaszámot, a kalásonkénti szemszámot valamint a kalásonkénti szemtömeget. Az adatokból kiszámítottuk a fertilitási illetve szemkötési és az ezerszemtömeg értékeket.

A csírázó képesség vizsgálata

A szemterméseket 8°C-os hőmérsékleten 7 napon át csíráztattuk. Ezt követően meghatároztuk a csírázó szemek arányát, illetve a csíragyökerek számát.

Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai értékelését varianciaanalízis (SSPS for Windows, version 10.0) segítségével végeztük.

Az eredmények összefoglalása

A szárazság hatása a víztartalomra és a termésre

- Megállapítottuk, hogy a talaj víztartalmát az általunk alkalmazott kezelések azonos mértékben csökkentették. A zászlóslevelek relatív víztartalma a meiózis idején csökkent a legkisebb, a korai szemfejlődés idején pedig a legnagyobb mértékben.
- Jelentős különbséget mutattunk ki a fajták fertilitásában illetve szemkötésében. A szárazságtűrő Plainsman V kalásonkénti szemszámát csak a korai szemfejlődés kori stressz csökkentette le szignifikáns mértékben, míg az érzékeny Cappelle Desprez mindhárom kezelés hatására szignifikáns csökkenést mutatott, amely a meiózis kori stressz esetében volt a legkisebb, a korai szemfejlődés kori stresszt követően pedig a legnagyobb mértékű.
- A kalásonkénti termésben a meiózis kori szárazság okozta a legkisebb, míg a korai szemfejlődés kori stressz a legnagyobb csökkenést. A fajták közül az összes kezelés esetében az érzékeny Cappelle Desprez szenvedte el a nagyobb mértékű terméscsökkenést.

Szövetteni és sztereológiai vizsgálatok

- Megállapítottuk, hogy a meiózis idején ható szárazság a két fajta közül az érzékeny Cappelle Desprez pollenfejlődésére gyakorolt jelentősebb negatív hatást.
- Kimutattuk, hogy az embriók fejlődésére az eltérő fenofázisban alkalmazott kezelések különbözően hatottak. A meiózis és az antézis idején a vízmegvonás mindkét fajtánál a fejlődés lassulását okozta, míg a korai szemfejlődés idején a növekedés és differenciálódás jelentős felgyorsulását figyeltük meg.
- Az endospermium és az azt körülvevő, a perikarpiumtól elválasztó sejtrétegek általános fejlődési folyamataira csupán a korai szemfejlődés kori stressz volt hatással, felgyorsítva azokat.
- Sztereológiai vizsgálataink eredményei szerint a három fenofázisban alkalmazott kezelés közül a sejtek és sejtalkotók szintjén csupán a korai szemfejlődés idején ható szárazság okozott szignifikáns eltéréseket. Az A típusú keményítőszemcsék száma az érzékeny genotípusnál nem változott, míg a Plainsman V-nél kis mértékben csökkent. Mindkét fajtánál jelentősnek bizonyult a B típusú keményítőszemcsék sejtenkénti számának csökkenése. A fehérjetestek száma a Cappelle Desprez esetében nem változott meg a kezelés hatására, míg a Plainsman V endospermiumában jelentős emelkedést mutatott.
- A Cappelle Desprez endospermiumában a korai szemfejlődés kori stressz hatására a kontrollhoz képest kisebb méretű sejteket figyeltünk meg, ami a sejtosztódást követő növekedés zavarára utal.

A szárazság hatása az élettani folyamatokra

- A fotoszintetikus rendszer működésével összefüggő paraméterek mindegyike a meiózis idején alkalmazott stressz hatására csökkent a legkevésbé, míg a legerősebb negatív hatást a korai szemfejlődés idején figyeltük meg.
- A meiózis és az antézis kori stressz hatására a Plainsman V a Cappelle Despreznél mind a kezelés, mind pedig a visszaöntözés során szignifikánsan

magasabb sztómakonduktanciát (g_s) és a nettó fotoszintetikus rátát (A_{net}) mutatott. Ezzel szemben a korai szemfejlődés idején a fajták értékei között nem volt szignifikáns különbség.

- Az intercelluláris széndioxid koncentráció (C_i) mérése során megfigyeltük, hogy a C_i inflexió pont az érzékeny Cappelle Desprez-nél a Plainsman V-höz viszonyítva a meiózis és az antézis kori stressz alatt korábban következett be, a korai szemfejlődés idején azonban mindkét fajtánál ugyanazon napra esett.
- Eredményeink szerint a kettes fotorendszer effektív kvantumhatásfoka (Φ_{PSII}) a meiózis kori stressz hatására egyik fajtánál sem változott meg. Az antézis idején a szárazságtűrő Plainsman V a visszaöntözés hatására szignifikánsan jobban regenerálódott. A korai szemfejlődés kori stresszt követően a fajtáknál hasonló értékeket mértünk. A Plainsman V a visszaöntözést követően ekkor is jelentős regenerációt mutatott, amely azonban statisztikailag nem volt szignifikáns.
- Kimutattuk, hogy a transzportált szacharóz felhasználását lehetővé tevő, azt hasító invertáz és szacharóz szintáz enzimek aktivitásának mértékét a búza fejlődő szemterméseiben az általunk alkalmazott kezelések lényegében nem befolyásolták.
- *In situ* hisztokémiai módszer segítségével lokalizáltuk a savas invertáz és a szacharóz szintáz enzimek aktivitását a fejlődő szemterméseken belül. A savas invertáz aktivitása a szemtermések alapi részén, valamint a szemtermések hasi barázdájában húzódó szállítószöveti elemekkel párhuzamosan jelent meg, míg a szacharóz szintáz kizárólag az ovulum, majd a későbbiekben a fejlődő endospermium területén volt megfigyelhető. Megállapítottuk, hogy ezt a mintázatot az alkalmazott kezelések nem befolyásolták.

A fajtákra jellemző ozmotikus adaptációs képesség

- Kimutattuk, hogy a szárazság hatására mindkét fajta képes ozmotikusan aktív anyagok felhalmozására. A szárazságtűrő Plainsman V fajta esetében a zászlóslevelekben a szárazság hatására bekövetkező ozmotikus potenciál

emelkedés, tehát az ozmotikus adaptációra való képesség több, mint háromszorosan haladta meg az érzékeny Cappelle Desprez-re jellemző értéket.

A szárazság hatása a csírázó képességre és a csíragyökerek számára

- Megállapítottuk, hogy az alkalmazott kezelések egyike sem okozott szignifikáns csökkenést a kezelt növényekről származó szemek csírázó képességében, ugyanakkor a csíragyökerek számában a korai szemfejlődés idején alkalmazott szárazság mindkét fajtánál visszaesést idézett elő, mely az érzékeny Cappelle Despreznél szignifikánsan nagyobb mértékű volt.

Következtetések

A strukturális és fiziológiai hatások elemzése alapján megállapítható, hogy az őszi búza esetében a vízhiány által kiváltott stresszhatás fejlődési állapot függőséget mutat. Mindkét fajta esetében bizonyítható volt, hogy mind a fiziológiai, mind pedig a termést érintő negatív hatások a meiózis idején jelentkeztek a leggyengébben, míg a korai szemfejlődés idején hatványozottan érvényesültek. A toleráns és érzékeny fajta fiziológiai válaszána összehasonlítása alapján a Plainsman V magasabb szintű toleranciájának egyik kulcseleme az ozmotikus adaptáció képessége, mely bizonyos határokon belül lehetővé teszi a felvett víz megtartását, és így a nagyobb sztómanyitottságnak köszönhetően a fotoszintézis fenntartását. Jelentős tényező a toleráns fajta által mutatott, a lombozat és a fiziológiai folyamatok esetében is megfigyelt magasabb szintű regenerációs képesség. Ez a tulajdonság különösen fontos erős stressz esetén, amikor a nagy mértékben eltérő ozmotikus adaptációs képesség ellenére a toleráns és az érzékeny fajta fiziológiai paraméterei között a vízmegvonás idején nem volt szignifikáns különbség. Megállapítottuk, hogy a szövetek szintjén csak a jelentős stressz okoz változásokat, azonban ezek a változások kiterjednek a B típusú keményítőszemcsék valamint a fehérjetestek számára, befolyásolva ezzel a termés minőségét. Jelentőséggel bír az érzékeny fajta esetében megfigyelt, az endospermiumra jellemző sejtnövekedési zavar, mely vélhetően csökkenti a szemtermés szénhidrát raktározó képességét, ezzel tovább redukálva a termést.

A termésbiztonság szempontjából fontos a két fajta által a szárazság hatásainak csökkentése érdekében választott eltérő stratégia. A Cappelle Desprez a fejlődés felgyorsításával a menekülés stratégiáját követi, míg a Plainsman V toleranciája a menekülés, elkerülés és elviselés elemeinek ötvözetén alapszik. A szárazságtűrő fajta által alkalmazott többféle stratégia hozzájárult a magasabb biomassa produkcióhoz és így a nagyobb terméshez.

Irodalmi hivatkozások

Augé RM, Duan X, Croker JL, Witte WT, Green CD (1998) Foliar dehydration tolerance of twelve deciduous tree species. *J Exp Bot* 49:753–759

Curtis BC (2002) Wheat in the world. In: Curtis BC, Rajaram S, Macpherson HG (Szerk.) Bread wheat. Improvement and production. FAO Plant Production and Protection Series, No. 30. Rome, 2002.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428

Ranwala AP, Miller WB (1998) Sucrose-cleaving enzymes and carbohydrate pools in *Lilium longiflorum* floral organs. *Physiol Plant* 103:541–550

Sergeeva LI, Vrugdenhil D (2002) In situ staining of activities of enzymes involved in carbohydrate metabolism in plant tissues. *J Exp Bot* 53:361–370

Spurr AR (1969) A low viscosity epoxy embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26:31–43

Tischner T, Kőszegi B, Veisz O (1997) Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. *Acta Agron Hung* 45:85–104

Weibel ER, Gomez DM (1962) A principle for counting tissue structures on random sections. *J Appl Physiol* 17:343–348

A tézisek alapjául szolgáló tudományos publikációk

Referált tudományos folyóiratban megjelent dolgozatok

Fábián A, Jäger K, Rakszegi M, Barnabás B (2011) Embryo and endosperm development in wheat (*Triticum aestivum* L.) kernels subjected to drought stress. *Plant Cell Rep* 30:551–563 (IF: 2.301)

Szűcs A, Jäger K, Jurca ME, Fábián A, Bottka S, Zvara A, Barnabás B, Fehér A (2010) Histological and microarray analysis of the direct effect of water shortage alone or

combined with heat on early grain development in wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol Plant* 140:174–188 (IF: 2.708)

Fábián A, Jäger K, Barnabás B (2008) Effects of drought and combined drought and heat stress on germination ability and seminal root growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Acta Biol Szeged* 52(1):157–159

Jäger K, **Fábián A**, Barnabás B (2008) Effect of water deficit and elevated temperature on pollen development of drought sensitive and tolerant winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Acta Biol Szeged* 52(1):67–71

Összefoglalók konferencia-kiadványokban:

Jäger K, **Fábián A**, Rakszegi M, Barnabás B (2011) Effect of drought on grain development in wheat. In: Veisz O (Szerk.) *Climate Change: Challenges and Opportunities in Agriculture* pp. 179–182.

Fábián A, Jäger K, Barnabás B (2011) A korai szemfejlődés idején alkalmazott vízmegvonás hatása különböző stressztoleranciával rendelkező búzafajták szemfejlődésére. In: Óvári J (Szerk.) XVII. Növénynem. Tud. Napok, Összefoglalók: "Növénynemesítéssel kultúrnövényeink sokféleségéért". p. 135.

Jäger K, **Fábián A**, Barnabás B (2011) Az epidermális bélyegek hatása az *Arabidopsis* és a búza aszálytűrésére. In: Óvári J (Szerk.) XVII. Növénynem. Tud. Napok, Összefoglalók: "Növénynemesítéssel kultúrnövényeink sokféleségéért". p. 137.

Fábián A, Jäger K, Barnabás B (2009) A meiózis idején alkalmazott szárazságstressz hatása a toleráns és érzékeny búza (*Triticum aestivum* L.) genotípusok szemfejlődésére. In: Veisz O. (Szerk.) *Hagyomány és haladás a növénynemesítésben*. pp. 106–110

Bálint A, Szira F, Galiba G, Jäger K, **Fábián A**, Barnabás B (2009) Szárazságtűrés vizsgálatok gabonaféléken. In: Veisz O. (Szerk.) *A martonvásári agrárkutatások hatodik évtizede 1999-2009*. pp. 43–48 (ISBN: 978-963-8351-35-7)

Fábián A, Jäger K, Barnabás B (2009) A meiózis idején alkalmazott szárazságstressz hatása a toleráns és érzékeny (*Triticum aestivum* L.) genotípusok szemfejlődésére. In: Veisz O (Szerk.) *Hagyomány és haladás a növénynemesítésben*: XV. Növénynem. Tud. Napok. pp. 106–110.

Jäger K, **Fábián A**, Barnabás B (2007) Az együttes hő-és szárazságstressz hatása a stressztoleráns és Plainsman és a stresszérzékeny Cappelle Desprez búzafajták szemfejlődésére. In: Kiss, J, Heszky L (Szerk.) XIII. Növénynem. Tud. Napok, Összefoglalók, p. 29.

Jäger K, **Fábián A**, Barnabás B (2006) Effect of heat stress and water deficit on embryo development in wheat (*Triticum aestivum* L.) In: Barnabás B, Jäger K (Szerk.) XIXth Int. Congress on Sexual Plant Reproduction, Budapest. „From gametes to genes” Book of Abstracts, pp 74–75.